

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ПРИРОДНО МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА**

Колева Р. Лилјана

**ОРГАНОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИЈА НА ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)
СОРТА КУРТОВСКА КАПИЈА ВО УСЛОВИ IN VITRO**

- Авторезиме на магистерски труд –

Скопје 1995

Членови на комисија

Проф. д-р Мирко Спасеноски, ментор

Редовен професор на Природно-математички факултет – Скопје

Проф. д-р Милто Мулев, член

Редовен професор на Природно-математички факултет – Скопје

Проф. д-р Данаил Јанкуловски

Редовен професор на Земјоделски факултет – Скопје

Датум на одбраната: 16.01.1996

Датум на промоцијата: 16.12.1996

НАУЧНА ОБЛАСТ: Физиологија на растенијата

ОРГАНОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИЈА НА ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)

СОРТА КУРТОВСКА КАПИЈА ВО УСЛОВИ IN VITRO

АПСТРАКТ

Основна цел на нашите испитувања беше да се постави култура од апикални пупки, котиледони и хипокотили, да се запознаат својствата на ткивата во *in vitro* услови, пред се нивниот потенцијал за органогенеза и регенерација во растение.

Апиклните пупки, котиледоните и хипокотилите беа изолирани од семиња кои се из`ртени во асептички услови, а потоа беа култивирани на MS медиум (Murashige и Skoog, 1962) минерален раствор со 3% сахароза, 0,7% агар а од хормоните беа користени IAA, IBA, GA₃, NAA, BAP и KIN додавани во медиумот во различни комбинации и концентрации

По 4 недели изданоци беа добиени само од апикални пупки, додека органогенезата на хипокотили на MS медиум се одвиваше во формирање на калус и лисни розети. Вкоренувањето на изданоците беше стимулирано со ниски концентрации на ауксини MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l IBA.

Културите беа држени во клима комора на контролирани услови и тоа: релативна влажност од 80%, фотопериодизам 16/8 светло/мрак, 25±1°C температура и осветлување од 2000-3000 Lux.

Добро вкоренетите растенија беа префрлени во пластични садови, наполнети со стерилна мешавина од песок, перлит и тресет (1:1:1), а нивната аклиматизација се одвиваше во три фази и тоа: во клима комора, потоа во пластеници, и на крај во надворешни услови.

По 6 недели *in vitro* регенерираните растенија се адаптираа на надворешната средина и нормално го завршија својот вегетативен циклус. Напоредно со *in vitro* регенерираните растенија во надворешни услови беа поставени и растенија добиени по конвенционален и стандарден начин на производство на пиперка, кои служат како контрола за испитување на некои биолошки, морфолошки и физиолошки карактеристики на растенијата.

Клучни зборови: Пиперка (*Capsicum annuum* L. сорта Куртовска капија), апикални пупки, котиледони, хипокотили, *in vitro*, органогенеза, регенерација.

IN VITRO ORGANOGENESIS AND REGENERATION OF PEPPER

(*Capsicum annuum* L. c.v. KURTOVSKA KAPIJA)

SUMMARY

The purpose of this work was to extend cultured tissues of apical buds, cotyledones and hipokotyls from pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Kurtovska kapija), to acquainted the tissue distinctively in „in vitro“ conditions and their responsibility for organogenesis and regeneration into hole plants.

The, apical buds, cotyledones and hipokotyls were isolated from aseptically grown seedlings, then they were cultivated on MS medium (Murashige and Skoog 1962) mineral solution with 3% sucrose, 0,7% agar and hormones IAA, IBA, GA₃, NAA, BAP and KIN, added in deferent combinations and concentrations.

After 4 weeks, pepper shoots were obtained only from apical buds, callus and root formation obtained from hipokotyls and callus and leaf rozzetes formation obtained from cotyledones.

Rooting of pepper shoots was stimulated on MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l IBA. Low levels of auxins were essential for rooting.

All cultures were incubated in climate room conditions with relative humidity of 80%, photoperiod 16/8 light/dark, 25±1°C temperature and illumination of 2 000 – 3 000 Lux.

The rooted plants were transferred into plastic pots, in a sterile miature of pert, send and perlite (1:1:1). The acclimatization went throught 3 stages: 1. Climate room conditions; 2. Plastic room conditions and 3. Outside climate conditions.

After 6 weeks the plants became adapted to normal climate conditions and they grew into regular normal plants. On the outside climate conditions, also were transferred and normal cultivated plants, which were used as on control grope to examined some biological, morphological and physiological characteristics of the plants.

Key words: pepper (*Capsicum annuum* L. c. v. Kurtovska kapija), apical buds, cotyledones, hipokotyls, in vitro, organogenesis, regeneration.

1. ВОВЕД

Зиготот ги содржи сите неопходни информации својствени на видот, а тој е тотипотентен или омнипотентен и се развива во нова единка со сите карактеристики на дотичниот вид. Во текот на диференцијацијата поедини клетки се специјализираат за обавување на поедини функции, при што губењето на тотипотентноста се манифестира со престанување на способноста за делба. Диференцираните клетки го завршиле својот развоен циклус само функционално, додека конституционално остануваат способни, во соодветни услови, да ја повратат својата тотипотентност.

Идејата за изолирање на растителни ткива базира на оригиналниот експеримент на германскиот ботаничар Gottlieb Haberlandt, кој во 1898 прв се обидел да ја провери тотипотентноста на растителната клетка. Требаше да помине половина век, за да кон крајот на 40-те години, со промена на новата техника, култура на растителни ткива, се реализира брилијантната идеја на Haberlandt-овиот експеримент.

Од досегашните истражувања може да се констатира дека регенерација на растение во култура е добиено од различни делови и органи на растението како: меристем, паренхим, калус, антери, поленови зрна, ембриони, изолирани поодделни клетки и протопласти, со што несомнено се потврдува претпоставката на Haberlandt и на други автори, дека секоја клетка од растителниот организам е тотипотентна. Според Steet (1977), може да се разликуваат повеќе типови на асептички култури од растително потекло: култура на ркулци или поголеми растенија (култура на растенија), изолирани зрели или незрели ембриони (култура на ембриони), изолирани растителни органи (култура на органи), култура на ткива добиени со пролиферација на сегменти од растителни органи (култура на ткива или култура на калус) и култура на изолирани клетки или мали клеточни агрегати, дисперзирани во течен медиум (култура на суспензија од клетки).

Оваа постапка, која сама за себе представува значаен феномен, и која првобитно се развивала воглавно во рамките на експериментални цели, во најново време наоѓа широка примена не само за решавање на теоретски проблеми туку и за задоволување на материјалната и естетската потреба на човекот.

Без оглед на тоа што има уште отворени прашања на кои се бара одговор, методот на растителни ткива се повеќе се усовршува и применува. Реално е да се очекува дека натамошните истражувањана биохемиските и физиолошки процеси на растителната клетка во услови *in vitro* ќе овозможува уште поголема примена на оваа метода за решавањето на бројни проблеми во областа на генетиката, оплеменувањето и размножувањето на растенијата (Kastori, 1991).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2.1 Значење на хормоните за индукција на растењето и органогенеза на културите

Според Steet (1990), морфогенезата е сложен процес кој го вклучува зачетокот и развитокот на сите растителни органи, нивната функционална поврзаност, како и развитокот на зиготот во комплетна единка. Таа добива нова анатомска и физиолошка димензија во култури на клетки и ткива низ процесот на органогенеза и регенерација на растенија од различни делови на растението, група на клетки, а во поново време дури и од единствена соматска клетка.

Според податоците на Günter (1974), неколку фитохормони се вклучени во контролата на клеточниот циклус, од кои цитокинините се едни од иницијалните фактори за комплетно заокружување на клеточниот циклус. Меѓутоа само цитокинините не се способни да ја отпочнат синтезата на DNA, но во комбинација со ауксини синтезата на DNA отпочнува.

Во услови *in vitro*, според Спасеноски (1993), може да се следи влијанието на одделни фактори врз органогенезата и диференцијацијата, од кои најчести се растителните хормони.

Затоа, несомнено е дека за растење и диференцирање на растителните клетки во *in vitro* услови, неопходни се сите познати хормони, кои треба да бидат застапени во одреден сооднос и по одделни фази, а кои покрај многубројните податоци не се доволно проучени (Спасеноски, 1993).

2.2 Досегашни работи со видови од родот *Capsicum*

Првите трудови на оваа култура во услови *In vitro* почнуваат да се објавуваат кон крајот на седумдесеттите и почетокот на осумдесеттите години, и претежно од фундаментален карактер.

Во истражувањата на Gunai и Rao (1978), добиена е регенерација, од хипокотили и котиледони на црвена пиперка *C. Annuum L.* и тоа на сортите California Wonder, Pimentio и на еден хибрид од видот *C. Frutescens* (Barath).

Покасно била добиена целосна регенерација до адултни форми, кај повеќе видови на пиперки (*C. Annuum L.*) од различни видови на експлантати: од котиледони (Kisaburo, 1988; Kenij, 1991), од хипокотили (Fari, 1981; Garcija, 1990), од врвни меристеми (Fitchet, 1990; Conjeo, 1992; Philip, 1992) и од сегменти на стебло (Gracija, 1990 Sim, 1986).

Постојат литературни податоци, кои говорат за успешна регенерација на пиперка од неорганизиран калус, антери, суспензија на клетки од протопласти. Така на пример со култура од антери со овој метод добиени се и хаплоидни и диплоидни хибриди на различни вариетети на пиперка (Dumas de Valux, 1981).

Спрема податоците од поголем број на автори може да се констатира дека поволна е можноста за клонска микропропагација на пиперката и нејзино комерцијализирање, со што можностите за добивање на производство подобро и по квалитет и по квантитет се зголемуваат.

3. ОСНОВНИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ИСПИТУВАНАТА КУЛТУРА, ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)

Една од поважните култури во светското производство на зеленчук е пиперката. По своите квалитетни својства, високи хранливи вредности и по вкус спаѓа во најраширениот и најценетиот вид меѓу градинарските култури.

Потеклото на пиперката го испитувале повеќе истражувачи. По De Candole (цит. Според Алаџајков, 1966), таа потекнува од Јужна Америка. Margraf и Piso ја споменуваат во Бразил по името Quya (куиа), а на Антилите одамна се одгледувала под различни карибски имиња. За Струмица и струмичко останал називот чушка.

Дивиот родоначалник за културната пиперка се уште не е установен, поради што многу автори сметаат дека *C. annuum* L. во Америка е многу стара култура, и не им била позната на старите Грци, Римјани и Египќани, па дури и на старите Кинези.

Плодот е богат со безазотни материи (гликоза, фруктоза, сахароза и многу малку скроб), има многу малку протеини и масти, а по содржината на витамин С, го надминува лимонот за 4-5 пати, а карактеристичниот мирис и лутиот вкус доаѓа од алкалоидот капсицин $C_{18}H_{29}O_3$.

Од вкупното производство на градинарски култури во Р. Македонија (60 000 ha) пиперката е застапена на 9 000 ha или околу 15%, таа е на второ место после домотот по застапеност во републиката. Сортата Куртовска Капија е распространета на површина од 3 500 ha, од кои 2 500 ha отпаѓаат само на струмичко поле или 71,5% од целокупното производство на оваа сорта е во струмичкото земјоделство.

4. ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО

Иако методата култура на растителни ткива и органи е релативно нова во современата биологија, која своите први фундаментални чекори во развиените научно-истражувачки центри ги направила во средината на овој век, денес има огромно апликативно значење во процесот на производството на здрави и квалитетни сорти и хибриди од градинарските култури.

Во Р. Македонија оваа метода почнала да се користи во последните петнаесетина години.

Овој труд преставува прв чекор во доменот на применета биологија, за регенерација на една стопански многу оправдана култура, а несомнено дека ќе даде и придонес за афирмацијата и популаризацијата на оваа метода за размножувањето во Република Македонија.

Како резултат на тоа, основна цел на нашите испитувања беше да се постави култура од апикални пупки, котиледони и хипокотили на сортата Куртовска капија, да се запознаат својствата на ткивата *in vitro*, пред се нивниот потенцијал за органогенеза и регенерација во растение, потоа да се добијат сознанија за нејзината способност за аклиматизација во надворешни услови, како би се овозможило интензивирање на производство на посадочен материјал и добивање на здрави растенија.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

За постигнување на поставените цели и одредување на битните физиолошки, морфолошки и производствени параметри користени се следните методи за работа:

Изолирање на почетни експланатати

Стерилизација на медиум

Состав на подлогата за одгледување на културите

Услови за одгледување на културите

Пренесување на културите во нестерилни услови

Одредување на агрохемиски и некои механички својства на почвата

Механички состав на почвата

Одредување на лесно достапен фосфор и калиум во почвата

Одредување на процентот на хумус и pH на почвата

Одредување на вкупен азот и карбонати во почвата

Одредување на некои морфолошки својства на растенијата

Одредување на некои биолошки својства на растенијата

Одредување на некои физиолошки својства на растенијата

Одредување на содржината на растителните пигменти

Согорување на растителен материјал

Одредување на содржината на фосфор

Одредување на содржината на K, Ca, Mg и Fe во растителниот материјал

Одредување на концентрацијата на клеточниот сок

Статистичка обработка на податоците

6. АГРОЕКОЛОШКИ УСЛОВИ

6.1. Климатски услови

Во југоисточниот дел од Република Македонија на $21^{\circ}27'$ северна географска ширина $22^{\circ}40'$ источна географска должина и на 224 м. надморска височина распространет е струмичкиот регион.

Според Филиповски (1952), ваквата местоположба го карактеризира струмичкиот регион со медитеранска клима од југ, но тоа влијание делумно е спречено од планинските масиви на Беласица, Огражден и Пљачковица. Оваа клима се одликува со суп високи температури, кои се призрак на изменетата медитеранска клима, која условува зима со средна температура над нулата, есента е потопла од пролетта а летата се суви и жешки.

Што се однесува до врнежите, во текот на вегетацијата паднале 177,5 mm дожд, укажува на релативно сушна година, а разликата од повеќегодишниот просек, чија вредност е 193,3 mm, врнежи повеќе.

Недостатокот од релативна влага во воздухот и од врнежи во вака аридни услови на културата и беа надополнети со наводнување, а во вакви услови одгледувањето на пиперка без напојување не е возможно.

6.2. Почвени услови

Струмичкото поле не се одликува со голем број почвени типови. Најголем дел се млади почви, без своја долга историја, без изразит почвообразовен процес и без типични за некој зонален тип морфолошки својства, па тешко може да се осети во која фаза на почвообразување минуваат.

Нашите испитувања на отворено беа поставени на алувијален почвен тип, на опитното поле во институтот за земјоделство во Струмица. Агрохемиските и некои механички својства на почвата се одредни во лабораторија на Институтот за земјоделие во Струмица. Од табелата се гледа дека структурата на испитаната почва ги задоволува критериумите на пиперката.

Почвата на опитното поле наесен е длабоко орана, а на пролет ѓубрена со 500 kg/ha NPK 15-15-15, а ѓубрењето е извршено пред култивирање на почвата. На 23.06.1994 година е извршено прихранување со урас со 27% N и тоа во количина од 330 kg/ha.

7. РЕЗУЛТАТИ

Сите иницијални експлантати: апикални пупки, хипокотили и котиледони беа изолирани од семиња кои пратат во асептички услови а потоа истите беа поставени на MS медиум, збогатен со различни концентрации и комбинации на растителни хормони, на кој беше пратена способноста за органогенеза и регенерација.

7.1. Хипокотили

Изолираните хипокотили со големина од околу 3 mm беа поставени на MS подлога во присуство на IAA и кинетин, а резултатите од влијанието на различните концентрации на овие хормони. Промени на експлантатите беа забележани уште во првите десетина дена од поставувањето во култура. Образовањето на калусот беше забележувано на местата на пресекот на експлантатот, и истиот се одликуваше со компактна и цврста структура и со светло зелена боја.

Присуството на GA_3 во медиумот, дури и во многу ниски концентрации, ја интензивира калусогенезата. Процентот на калусирани експлантати е 100% во присуство на само 0,2 mg/l GA_3 во подлогата. Ваквите истражувања се во согласност со тие на Murashige (1965), кои покажале дека и најниски употребени концентрации на GA_3 ($1,5 \times 10^{-7} M$) го редуцираат формирањето на пупки на калусот од сржта на стеблото кај тутунот, и го спречува формирањето на меристемоиди во калусот што е предуслов за секоја регенерација (цит. по Цветановска и Спасеноски, 1992).

7.2. Котиледони

На MS медиум, со различни комбинации и концентрации на фитохормони, исто така беа поставени и котиледоните со почетна големина од 1,0 cm. После десетина дена беа забележани првите промени на експлантатот. За тоа време тие добиваа темно зелена боја и градба на типичен лист. Вакви промени беа забележани и кај котиледони од патлиџан поставени на MS медиум во присуство на GA_3 1mg/l и 0,5 mg/l кинетин (Цветановска и Спасеноски, 1992).

Гиберелинската киселина во комбинација со кинетин и IAA на MS медиум, покажува скоро ист ефект како и кај хипокотилите. И во овој случај се забележува извесно зголемување на должината на котиледоните до 3,36 cm, во присуство на 0,2 mg/l GA_3 . Процентот на калусираните експлантати беше 90,66%, додека формирање на лисни розети не беше забележано. И кај котиледоните се покажа дека гиберелинската киселина го фаворизира калусирањето на експлантатите, што ја спречува натамошната органогенеза на котиледоните.

Што се однесува до процентот на формирањето на лисни розети на испитуваните медиуми во присуство на GA_3 се движи од 44,16 % - 50,00% а на MS медиумот во присуство на 1,0 mg/l кинетин, 0,1 mg/l IAA и 0,2 mg/l GA_3 каде концентрацијата на GA_3 е поголема, формирањето на лисни розети отсуствува.

Секој вид т.е. сортет има специфични одговори на даден хормонален третман во услови *in vitro*, кои се карактеристични и се однесуваат само за дадениот вид т.е. сортет, а применет на блиски или сродни видови т.е. сорте даваат различен ефект на хормонален третман.

7.3. А п и к а л н и п у п к и

Апикалните пупки од Куртовска капија беа земени, исто така како и претходните два експлантати, од семиња кои се изртени на 1/2 MS минерален раствор во стерилни услови, а по нивна изолација беа поставени на подлога обогатена со различна содржина на IAA, GA₃ и KIN.

Средната должина на изданоците, формирани од апикални пупки, незначително е поголема на медиуми со поголема концентрација на кинетин. Изданоците беа најкратки на медиум со 1,0 mg/l KIN, 0,76 cm, а на медиумот со 5,0 mg/l KIN имаа големина од 1,65 cm, при концентрација на IAA од 0,1 mg/l.

Према литературни податоци големината на апикалните пупки зависи од видот на културата. Така во испитувањата на Спасеноски (1991), за регенерација на тутун биле користени апикални пупки со големина од 1 mm, Жарко и Спасеноски (1994), за регенерација и размножување на гербер (*Gerbera jamesonii*) изолираше пупки со 2-3 лисни примородии, а за вегетативно размножување на кинеска рибизла (*Actinidia chinensis Planch*). Спасеноски и Нешковиќ (1985), користеле врвни делови од стебло со големина 1-2 mm.

Откако изданоците, формирани од апикалните пупки на иницијалните подлоги, достигнаа извесна големина 2-3 cm, истите беа субкултивирани на MS медиум збогатен со ауксини. Во ваква средина, збогатена со ауксини, изданоците формираа корени, што значи дека ауксините ја фаворизираат ризогенезата на истите. Тоа субкултивирање беше извршено со претходно отстранување на калусот од изданоците, кој се формираше на основата на изданокот, а со неговото отстранување изданоците без калус беа префрлени на MS медиумот за вкоренување.

7.4. Адаптација на *in vitro* добиени растенија од стерилни во нестерилни услови

Во оваа фаза на аклиматизација успешно се адаптираа 80% од растенијата. Во следната фаза, кога растенијата беа пренесени во пластеници, во нестерилна мешавина на баштенска земја и тресет во однос 1:1, процентот на успешна адаптација беше само 41,7%. Дури во последната етапа од постепената адаптација (отворени леи), расадот добиен од култура се аклиматизира на природни услови, растенијата нормално се развиваа и ги поминаа сите фенофази од вегетативниот циклус.

7.5. Морфолошки карактеристики на плодовите

Морфолошките карактеристики на плодовите добиени од „*in vitro*“ растенијата не се разликуваа битно не се разликуваа од оние на контролните растенија. Единствена, но многу важна, а воедно и статистички сигнификантна беше разликата во просечната маса на плодот.

Просечната должина и ширина на плод беше незначително поголема кај контролните растенија. Плодовите на контролните растенија ($14,16 \pm 0,093\text{sm}$) просечно беа за $0,11\text{ sm}$ подолги од плодовите на *in vitro* добиени растенија ($14,05 \pm 0,21\text{sm}$). Просечно пошироки за $0,98\text{ sm}$, од „*in vitro*“ добиени плодови ($4,92 \pm 0,054\text{sm}$) беа контролните плодови ($5,90 \pm 0,066\text{sm}$).

7.6. Производствени карактеристики на плодовите

Како и морфолошките така и производствените карактеристики на плодовите, добиени од „*in vitro*“ и од контролните растенија, битно не се разликуваат.

Разликата во бројот на семки по плод е статистички несигнификантна. Во плодови од *in vitro* добиени растенија имаше по $168 \pm 8,352$ семки, а во плодовите од контролните растенија по $221 \pm 7,764$ семки.

Мошне сигнификантни разлики се јавија во масата на плодови, како до III етаж така и по целото растение. Значително поголеми вредности, за овие две производствени својства на плодови, беа регистрирани кај контролните растенија. Така масата на „*in vitro*“ плодови до III етаж изнесува $231,1 \pm 7,493\text{g}$. а по целото растение $472,19\text{g}$. додека кај контролата, плодови до III етаж тежат $425,3 \pm 6,462\text{g}$. а по целото растение $577,51 \pm 8,515\text{g}$.

Овие разлики резултираат и со разлика во приносот по хектар. Во овој случај „*in vitro*“ добиените растенија би дале $37,727\text{ kg/ha}$ а контролните $41,250\text{ kg/ha}$.

7.7. Физиолошки карактеристики на *in vitro* добиени контролни растенија

Физиолошките карактеристики на растенија беа испитувани во две фази од развитокот на растенијата и тоа:

- Фаза на цветање, (75% масовно) и
- Фаза на плодоносење (ботаничка зрелост).

Беа следени следните физиолошки параметри:

Содржина на вода

Содржина на суви материи

Содржина на растителни пигменти

Концентрација на клеточен сок (%) во листови на пиперка

Содржина на биогени елементи:

Фосфор

Калиум

Калциум

Магнезиум

Железо

8. ДИСКУСИЈА

Врз основа на нашите испитувања за: способноста за органогенеза на испитуваните иницијални експлантати од пиперка сорта Куртовска капија; за влијанието на одредени фитохормони врз растот и развитокот на изданоците во културите; нивната адаптација на нестерилни услови; како и за морфолошките, биолошките и физиолошките својства на растенијата во текот на вегетацијата, ќе се обидеме да дадеме извесни објаснувања и дискусија на добиените резултати.

Гиберелинската киселина значително ја зголемува калусогенезата, а со тоа ја спречува натамошната органогенеза на хипокотилите во култура. Органогенезата во нејзино присуство оди исклучиво во формирање на калус, иако се знае дека нејзина примарна функција е за клеточна елонгација.

Од резултатите може да се констатира дека способноста за органогенеза мошне зависи и од положбата на експлантатот во медиумот. Хипокотили поставени во акропетална или базипетална положба, покажуваат различна способност за органогенеза. Според добиените резултати, евидентно е дека морфогенетскиот потенцијал на хипокотили е највисок на апикалниот дел т.е. на врвот на експлантатот каде е и најинтензивна делбата на клетките, и каде престижно се формираат корените, калусот и лисните розети. Оваа е во согласност со испитувањата на Fari и Czako (1981), како и на други автори, кои установиле дека врвните делови на хипокотилот од пиперката (*Capsicum annuum* „T. Hatvani“) имаат највисок морфогенетски потенцијал, а само од нив добиле комплетна регенерација на пиперката.

Имајќи го предвид фактот дека меристемот е ткиво на најмала диференцијација и најголема способност за делба, логично е да се очекува дека неговиот морфогенетски потенцијал за регенерација во услови *in vitro* би бил највисок во споредба со преостанатите експлантати. Неслучајно многу автори (Murashige, 1979; Boxus и Durat, 1980; Debergh и Read, 1991; Seskinger, 1991; Redenbang, 1991) за клонска микропропагација препорачуваат користење исклучиво на апикални меристеми, несамо заради погодноста на ткивото за брза регенерација туку и заради генетската стабилност на добиените регенеранти.

Во нашиот случај, одделните фенофази кај *in vitro* добиените растенија се јавуваат порано за разлика од истите на контролните растенија. Така појавата на почетното (10%) цветање кај *in vitro* добиените растенија се јавува за еден ден порано за разлика од контролните растенија. Во натамошниот развиток на растенијата следните фенофази кај *in vitro* добиените растенија се појавуваа се порано и порано. Масовното (75%) плодносење поранува за 3 дена, почетната (10%) технолошка зрелост за 5 дена, почетната (10%) ботаничка зрелост за 7 дена а масовната (75%) за 8 дена.

Сето оваа на крајот резултира со пократок вегетационен период на растенијата добиени во *in vitro* услови, и тоа за 18 дена пократка вегетација од контролните растенија. Меѓутоа и контролните растенија кои имаа 162 дена вегетациски период, и *in vitro* растенијата со 144 дена вегетација, до појавата на масовната ботаничка зрелост, според должината на вегетациониот период спаѓаат во доцностасите сорти пиперки.

Од добиените резултати евидентно е дека, со исклучок на листови во фазата цветање, сите други поодделни органи на растенијата, поголема содржина на вода имаат во *in vitro* добиените растенија. Регенерираните растенија со самото тоа што содржат

поголем процент на вода во текот на целата вегетација во однос на контролата, имаат тенденција за запазување на својот „јувенилитет“ (што исто така се забележува и од појавата на одделените фенофази и должината на вегетациониот период, како резултат на пролонгирање на јувенилните стадиуми за сметка на репродуктивните стадиуми). Според Castori, (1991), млади ткива, органи и растенија, обично имаат поголема содржина на вода, бидејќи протоплазмата на нивните клетки е многу хидратирана и е обвиеана со тенок клеточен сид. Затоа, со тенденција на запазување на својот „јувенилитет“, *in vitro* регенерираните растенија имаат поголема содржина на вода.

Резултатите од нашите испитувања покажаа дека, содржината на сувите материи не е во инверзна корелација со содржината на вода во поодделните органи на растенијата во текот на вегетацијата. Оваа појава е сосема очекувана, а значи дека во органите на растенијата каде содржината на вода е поголема, содржината на суви материи има пониски вредности.

Со промената на начинот на исхрана од хетеротрофен (во културите), во автотрофен (за време на адаптацијата), неизбежни се промени во фотосинтетскиот и ензимскиот систем на *in vitro* регенерираните растенија.

Ако изданоците во култури ја имаат зелената боја, нема доволно докази за нивна фотосинтетска активност. Фотосинтетските пигменти, хлорофили, се присутни во изданоци во култура, но ензимите за нивна активација отсутствуваат или ако се присутни тие може да се неактивни (Murashige, 1979). Ензимската синтеза или нивната активација најверојатно почнува непосредно по пренесувањето на изданоците од културите надвор. Во контекст на истиот автор, интензивната синтеза на сите растителни пигменти и нивните ензими започнува неколку дена по изнесувањето на културите во надворешни услови.

Од нашите резултати за содржината на растителни пигменти може да се констатира дека содржината на сите испитани растителни пигменти во фазата цветање е помала во *in vitro* растенијата, а во фазата на плодносење обратно. Имајќи ги предвид гореспоменатите факти добиените резултати за содржината на растителните пигменти сосема се разбирливи.

Тоа значи дека *in vitro* добиените растенија отпочнуваат со својата фотосинтетска активност непосредно пред нивната целосна адаптација, затоа содржината на растителни пигменти е помала во фазата на цветање. Откако ензимската биосинтеза е воспоставена и фотосинтетските процеси се отпочнати, култиварите ја зголемуваат содржината на фотосинтетски пигменти, што резултира и со поголеми вредности на истите во *in vitro* добиените растенија, во однос на контролата, во фаза на плодносење.

Што се однесува до концентрацијата на клеточниот сок, од добиените резултати се гледа дека, вредноста на оваа својство, е незначително поголема кај *in vitro* добиените растенија во фазата на цветање во споредба со контролните растенија. Тоа значи дека во оваа фаза *in vitro* добиените растенија имаат нешто поголема енергија на вшмукување, а исто така и поголема содржина на вода. Во фазата на плодносење контролата има поголеми вредности, за концентрацијата на клеточниот сок, во однос на *in vitro* добиените растенија.

9. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на добиените резултати од досегашните испитувања можеме да ги извлечеме следните заклучоци:

1. Способноста за органогенеза на иницијалните експлантати од пиперка сорта Куртовска капија, на MS медиум збогатен со кинетин и IAA е поголем котиледоните од хипокотилите.
2. На MS медиум збогатен со кинетин 1,0 – 10,0 mg/l IAA во концентрација од 0,1 mg/l органогенезата на хипокотили оди исклучиво во правец на калусогенеза и ризогенеза.
3. На MS медиум во присуство на кинетин 1,0 – 10,0 mg/l IAA во концентрација од 0,1 mg/l котиледоните формираат исклучиво лисни розети и калус.
4. Апикалните пупки од пиперката, сортата Куртовска капија, на MS медиум во присуство на кинетин 1,0 – 10,0 mg/l IAA 0,05 -0,2 mg/l и GA₃ 0,05 -0,2 mg/l, за само неколку дена образуваат изданок. Од сите иницијални експлантати истите имаа највисока способност за регенерација во култура.
5. Кај сите иницијални експлантати се покажа дека цитокинини, во присуство на ауксин, во поголеми концентрации стимулативно делуваат на органогенезата, со намалување на процентот на калусирани експлантати. Во тој поглед се покажа дека од цитокинините BAP има поголем ефект за разлика од кинетинот.
6. Кај сите иницијални експлантати се констатира дека гибералинската киселина, аплицирана ва MS медиумот дури и во ниски концентрации од 0,05 mg/l ја фаворизира калусогенезата.
7. Со зголемувањето на бројот на субкултивирањата, и кај котиледоните и кај хипокотилите, способноста за органогенеза значително се намалува, а органогенезата во тој случај оди исклучиво во правец на калусогенеза.
8. Калусот, кај сите иницијални експлантати на MS медиум присуство на IAA, GA₃ и кинетин, е не-регенеративен (без способност за образување на ембрионидна структура и формирање на изданок), со компактна и многу цврста когзистенција и светло зелена боја.
9. Вкоренувањето на изданоците на пиперката, сорта Куртовска капија, беше добиено на MS медиум во присуство само на ауксини. Помали концентрации на ауксини ја фаворизираат ризогенезата, а најдобро вкоренување (83,95%) беше добиено на MS медиум во присуство на 0,04 mg/l IAA и 0,1 mg/l IBA.
10. Адаптацијата на *in vitro* добиените растенија, низ трите фази на аклиматизација, беше успешна кај 32,85% од регенерантите, додека во надворешните услови сите *in vitro* регенерирани растенија добро се аклиматизираа.
11. Што се однесува до биолошките својства, *in vitro* добиените растенија имаа способност за зачувување на „јувенилитетот“. Репродуктивните фенофази кај нив пократко траеја, а по однос на должината на вегетативниот период тие имаа пократка вегетација од растенијата добиени во надворешни услови.
12. Гранењето кај *in vitro* добиените растенија настанува порано во фазата на расадување, како последица на хормонскиот третман, а во фазата на цветање,

гранењето и кај контролните и кај *in vitro* добиените растенија е изедначено и е двоетажно.

13. *In vitro* регенерираните растенија ги запазуваат сите сортни карактеристики на пиперката Куртовска капија. Настанатите статистичко сигнификантни разлики во должината на кореновиот систем и тежината на плодовите се резултат на различните услови на одгледувањето.
14. Содржината на растителните пигменти во почетокот на вегетацијата е поголема кај растенијата добиени во надворешни услови, а кон крајот на вегетацијата, во фазата на плодоносење, поголема во *in vitro* добиените растенија.
15. Биогените елементи P, K, Ca, Mg и Fe имаат нормална динамика и кај *in vitro* добиените растенија и кај контролните растенија. Содржината на K е поголема кај регенерантите во текот на целата вегетација (со исклучок на листот во фазата на цветање и стеблото и плодот во фазата на плодоносење, каде калиумот има поголеми вредности за контролата), а содржината на Fe е исто така поголема кај *in vitro* добиените растенија, (со исклучок на коренот во фаза на цветање), во однос на растенијата во надворешни услови, што укажува на запазувањето на јувенилноста на регенерантите.
16. Од апикалните пупки на пиперката, сортата Куртовска капија, преку образување на адвентивни изданоци и корени на MS медиум, е постигната комплетна регенерација. Регенерираните растенија успешно се адаптираа на надворешни услови, нормално се развиваа и ги поминаа сите фази од развојот.

Овој труд, како еден од првите чекори во Р. Македонија во доменот на применета биологија, може да има апликативно значење во процесот на производството на посадочен материјал, добивање на здрави растенија, а воедно и добивање на поквалитетно производство по единица површина.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Алаџајков, Л. (1966). Специјално градинарство, издание на универзитетот во Скопје, 425-482.
2. Алаџајков, Л. (1966). Општо градинарство, издание на универзитетот во Скопје.
3. Boxus, Ph. (1980). Micropropagation, an industrial propagation method of quality plants true to type and at a resonable price, Plant Cell Cultures, 265-269.
4. Boxus, Ph. (1979). Meristem culture from production of virus-free Prunus, IXth International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, Acta Horticulturae 44, 43 – 45.
5. Boxus, Ph. and Druat, P. (1986). Virus – Free Trees Through Tissue Culture, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 124 -30.
6. Conejo, B. A., Palma Zuniga, T. (1992). In vitro micropropagation of pepper (*Piper nigrum*), Technologia en Marcha, V., 11 (3), 23 -30.
7. Цветановска, Л., Спасеноски, М. (1991). Хормонална регулација на растот и развитокот на апикални пупки кај патлиџан (*Licopersicum Esculentum* сорта Балка) во услови in vitro, Год. зб. Биол. кн. 43 - 44, с. 243 – 249.
8. Цветановска, Л., Спасеноски, М. (1992). Хормонална регулација на растот и развитокот на котиледони кај патлиџан (*Licopersicum Esculentum* сорта Балка) во услови in vitro, Год. зб. Биол. кн. 45, с. 213 – 221.
9. Цветановска, Л., Спасеноски, М. (1994). Содржина на хлоропласни пигменти и некои биогени елементи кај домат (*Licopersicum Esculentum* сорта Балка и Домбито) добиени во услови in vitro и во надворешни услови, Год. зб. Биол. кн. 47, с. 155 – 164.
10. Debergh, P. C., Read, P. E., (1991). Micropropagation, Technology and Application, Kluwer Academic Publisher, 1 – 13.
11. Druat, Ph., (1981). Embriogenese somatique obtention de plantules chez Prunus incise x serrula (GM9) cultivate in vitro, Bull. Rech. Gembloux 16 (3), 205 – 220.
12. Druat, Ph., (1980). Plantlet regeneration from root callus of different Prunus species, Scientia Horticulturae, 12. 339 – 342.
13. Dumas de Valux, R. (1981). In vitro culture of pepper (*Capsicum annuum L.*) anthers: hight rate plant production from different genotypes by +35°C treatments, Agronomie, 1 (10), 859 -864.
14. Fari, M., Czako, M. (1981). Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro, Scientia Horticulturae, V. 15 (3), 207 -213.
15. Fasolo, F. (1988). Adventitious shoot formation on excised leavels of in vitro grown shoots of apple cultivars, Plant cell, Tissue and Organ Culture 16: 75 -87.
16. Филиповски, Ѓ. (1952). Природни услови во земјоделството на НРМ, Скопје.
17. Филиповски, Ѓ. (1948). Почвите на струмичко поле, Годишен зборник на Земјоделско-шумарскиот факултет, Книга II.
18. Fitcher, M. (1990). Establishments of Piper nigrum in vitro, Acta Horticulturae, (275), 285 – 291.
19. Garcija, R.A. (1990). Tissue and cell culture of pepper (*Capsicum annuum L. cv. Pico and cv. piquillo*), APHF/SECH, 249 – 254.

20. Graebe, J. E., Hedden, P., Rademacher, W. (1980). Gibberelin Biosintesis, British Plant Growth Regulator Group, Monograph 5, 31 -47.
21. Günter, F. (1974). Developmental Physiology, Progress in Botany/ Fortchitte der Botahik 36, 147 -166.
22. Gunay, L., Rao, P. S. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*), Plant Science Lettera, 11, 365 -372.
23. Hu, C. Y. and Wahg, P. J. (1985). Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures, Handbook of plant cell culture, Techniques for Propagation and Breeding, Volume1, 177 -209.
24. Јакимов, Д. и соработници (1994). Селекција на пиперките. ИРЕ „Институт за земјоделство“ Струмица, Струмица март 1994.
25. Јанкуловски, Д. (1983). Проучување на биолошките, морфолошките и квалитетните својства на поважни популации долги пиперки (*Capsicum annuum L. Sun. C. Mexicanum Haznb*) во СР Македонија, докторска дисертација.
26. Castor, R. (1991). Fiziologija biljaka, Nauka, Beograd.
27. Castori, R. (1983). Uloga elementa u ishrani biljaka, Matica Srpska, Novi Sad, 1983.
28. Kenij, K., Yoko, S., Tomoyuki, N., Kisaburo, H. (1991). Effects of interaction between Variety and Culture Medium on Induction Capacity of Adventitious Bud from Cotyledon Explant in Pepper *Capsicum annuum L.*, Agricultural Science, Vol. 40, 19 -32.
29. Keveres, CI, (1982). In vitro Promotion of Root Formation by Apple Shoots through Darkness Effect on Endogenous Phenols and Peroxidases, Z. Pflanzenphysiologie, Band 108, S. 429 – 436.
30. Kisaburo, H., Zhiqing, Y., Kenij, K. (1988). The Effects of Cotyledon Explant and Culture Condition on in vitro Formation of Adventitious Buds in Red Pepper (*Capsicum annuum L.*) Agricultural Science, V. 37, 153 – 159.
31. Кефели, В. И. (1973). Рост Растений, Москва, «Колос» 1973.
32. Колева, Л., Спасеноски, М. (1994). Регенерација на пиперка (*Capsicum annuum L.*) од апикални пупки во улови in vitro, Зборник на трудови „Нови технологии во градинарството и цвекарството“, Охрид 1994, Книга I, с. 203 – 207.
33. Коцевски, В. (1994). Влијание на разни дози и односи на хранливите материи од минерални ѓубриња врз приносот и квалитетот на пиперката Куртовска капија на алувијална почва во струмичко, Струмица 1994 год.
34. Коцевски, В. И група автори (1995). Напоредно испитување на органски и минерални ѓубрења, врз приносот, квалитетот и морфолошките особини на пиперката, сорта Куртовска капија, Струмица 1995 год.
35. Матејева, Ј. (1983). Систематика на вишите растенија, НИП Студентски збор, Скопје.
36. Mathews, H. and Rao, P. S. (1984). In vitro responses of Black Pepper (*Piper nigrum*), Current Science, Vol. 53, No 4, 183 -185.
37. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium from Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum Vol. 15, 473 -497.
38. Murashige, T. (1979). Principles of rapid propagation, Propagation of higer plants through Tissue Culture, Pr 14 -24.
39. Petrova, S., Antonova, G., Rodeva, V. (1994). In vitro plant regeneration from hypocotyls and cotyledons of *Brassica Olaracea capitata L.* Зборник на трудови „Нови технологии во градинарството и цвекарството“, Охрид 1994, Книга II, с. 413 - 417.

40. Philip, V. J, Joseph, D., Triggs, G. S., Dickinson, N. M. (1992). Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) triught shoot tip cultures, Plant cell reports, V. 12 (1), 41 – 44.
41. Philips, C. G. (1985). Organogenesis in Pepper tissue Cultures, Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, 261 – 269.
42. Redenbaugh, K, (1991). Applications of micropropagation for agronomic crops, Technology and Application, Kluwer Academic Publisher.
43. Saric, M. (1990). Praktikum iz fiziologije biljaka, Naucna kniga, Univerzitet u Novom Sadu, 1990, Drugo izdanje.
44. Saric, M. (1987). Fiziologija biljaka, Naucna Kniga, Beograd.
45. Seckinger, G. R. (1991). Micropopagation of vegetable crop species, Technology and Application, Kluwer Academic Publisher, 265 – 284.
46. Sim, S. L. (1986). Propagation of single-node pepper *Piper nigrum* cuttings, Jurnal Announcement, 105 – 113.
47. Swart, H. J. (1993). Genetic and epigenetic effects and related problems, Post culture behavior, pp 95 – 121.
48. Spasenoski, M., Neskovic, M. (1985). In vitro vegetative propagation of *Actinidia chinensis* Planch. from juvenile and adult plant segments, Bulletin de l' Institute et du Jardin Botaniques de l' Universitete de Belgrad, Tom XIX, p. 7 – 13.
49. Спасеноски, М. (1991). Содржина на никотин во експлантати од тутун (*Nicotiana tabacum*) во услови in vitro, Год. зб. Биол. кн. 43 – 44, с. 235 – 241. Скопје 1991.
50. Спасеноски, м. (1993). Вегетативно размножување кај некои растителни видови во услови in vitro и можности за добивање на здрав растителен материјал, Зборник на трудови од XVIII советување за заштита на растенијата, Охрид 1993, Том5, с. 145 - 148.
51. Спасеноски, М., Марковска, О. (1994). Регенерација на тутун (*Nicotiana tabacum*) тип – Прилеп во култура ин витро, Год. зб. Биолог. Кн. 47 с. 143 – 154.
52. Srejovic, V. (1980). Indukcija kalusa i organogeneza na izolovanim kotiledonima heljde (*Fagopyrum esculentum* Moeuch), magisterski rad, Kragujevac 1980.
53. Street, H. E. (1990). The anatomy and physiology of morphogenesis, Studies involving tissue and cee cultures, Botanical Laboratories, University of Leicester, England, 21 – 33.
54. Trewavas, A. J. (1982). Growth substance sensitivity: The limiting factor in plant development, Phisiologia Plantarum 55, 60 -72.
55. Турецкај, Р. Х. (1968). Предвижение ауксинов в растениих, Успехи современной биологии, Москва, Том 66, 102 -120.
56. Жарко, Л., Спасеноски, М. (1994). Размножување на гербер од апикални пупки во услови in vitro, Зборник на трудови „Нови технологии во градинарството и цвеќарството“, Охрид, април 1994, с. 613 - 619.